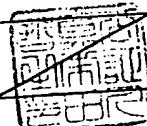


眞栄田

登簿平成 8 年第 1157号

嘱託人 浜野 孝雄 は本公証人の面前で別紙 翻訳  
証明書に署名した。

以上認証する。



平成 8 年 7 月 19 日 本職役場において

東京都千代田区内幸町2丁目1番1号

霞ヶ関公証役場

東京法務局所属

公証人

眞栄田 智



I, undersigned, Takao HAMANO, Patent Attorney, of Bussan Building Bekkan, No. 1-15, Nishi-Shimbashi 1-Chome, Minato-ku, Tokyo, Japan, well understand both the Japanese and English languages, and the attached English language specification is a full, true and faithful translation made by me of the Japanese language specification of Japanese Patent Kokai (Pre-Examination Publication) No. 80-162993 (Application No. 79-72085) entitled "A PROCESS FOR PREPARING CLAVULANIC ACID" in the name of SANRAKU-OCEAN CO., LTD.

This 19th day of July, 1996

Takao Hamano  
Takao HAMANO

This document was subscribed before me  
by the above-named person(s) on this day

JUL 19 1996



Tetsu Maeda  
TETSU MAEDA  
NOTARY

NO. 1-1, 2-CHOME UCHISAIWAICHO  
CHIYODA-KU TOKYO JAPAN



PRE-PUBLISHED PATENT GAZETTE

Pre-Publn. (Kokai) No. 80-162993

Pre-published Date: December 18 1990

Examination: Requested

Int. Cl. No. 613B 17/110

(C12P 17/18)

C12R 1/465)

Title: A process for preparing clavulanic acid

Application No. 79-72085

Filing Date: June 7, 1936

Inventors: Kazuhiko Sato

2502-1, Fujisawa, Fujisawa City  
et al

Applicant: Sanraku-Ocean Co., Ltd

1-15-1, Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo

Patent Attorneys: Takeshi Yano, et al

## Specification

1. Title of Invention:

## A process for preparing clavulanic acid

## 2. Claim:

1. A process for preparing clavulanic acid, characterized in that the process comprises aerobically cultivating a new strain, P6621 (Deposit No. FERM-P 2804 in Fermentation Research Institute) which belongs to the genus *Streptomyces*, and thereby accumulating clavulanic acid in the culture obtained.

3. Detailed description of the invention

The present invention relates to a process for preparing clavulanic acid using a new strain P6621 which belongs to the genus Streptomyces.

Clavulanic acid is a substance isolated from a culture broth of Streptomyces clavuligerus (Japanese Patent Publication No. 77-1996 and A.G. Brown, et al: Journal of Antibiotics, vol. 29, pp. 668, 1976). It has a relatively weak antibacterial activity against gram positive and negative bacteria, but has a strong  $\beta$ -lactamase inhibiting activity, and this compound is noteworthy as  $\beta$ -lactamase inhibitor. The  $\beta$ -lactamase inhibiting activity can be used together with penicillins and cephalosporins, to increase the antimicrobial activity of these  $\beta$ -lactam antibiotics against resistant strains capable of producing  $\beta$ -lactamase. Clavulanic acid has a new skeleton, and thus it is a useful substance valuable as a raw material for synthesizing semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics which have said skeleton.

Clavulanic acid-producing strains known hitherto include Streptomyces clavuligerus NRRL 3585, ATCC 27064, FERM-P No. 3007 (Japanese Patent Publication No. 77-1996), Streptomyces jumonjinensis No. 3008 strain, FERM-P No. 1545, NRRL 5741 (Japanese Patent KOKAI No. 77-47991), and Streptomyces katsurahamanus FERM-P No. 3944, IFO 13719 (translator's note: correctly 13716) (Japanese Patent KOKAI No. 78-104796).

The clavulanic acid-producing strain used in the process of the present invention is a new ray fungus of Actinomycetes. Its typical strain was isolated onto a yeast-malt agar medium from a soil sample of Saitama Suijo Park, Ageo City, Saitama Prefecture in April, 1974, and was named as strain No. P6621. Since its culture broth contains 7-(5-amino-5-carboxylvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid accumulated, a process for preparing said acid using said strain was already proposed (Japanese Patent KOKAI No. 76-110097).

Later, the present inventors have found that the strain P6621 produces a substance which has antimicrobial activity but is different from 7-(5-amino-5-carboxylvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid in the culture broth, and they designated this substance as P6621 Factor-3. This substance was isolated, examined and identified as a known substance "clavulanic acid" as described later. Thus the present invention has been completed.

The P6621 strain which belongs to the genus *Streptomyces* and is used in the present process has the following microbiological characteristics.

1) Morphological properties

When the P6621 strain as grown on a yeast-malt agar culture medium at 28°C for 10 to 20 days is observed, aerial hyphae are simply branched and extend well, and their tips

are straight or slightly curved. Neither whirls nor sporangia are formed, and sclerotia are not observed. Spores are little observed but rarely formed, and the surface is smooth.

2) Properties on culture-media

The properties of P6621 strain on the following various media were observed after incubating the P6621 strain at 28°C for 14 days, unless otherwise stated.

(1) Sucrose nitrate agar medium

Obverse: White

Reverse: White

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Medium to slightly-weak

(2) Glucose-asparagine agar medium

Obverse: Little aerial hyphae are formed, and the surface is grayish.

Reverse: White, but partially is light yellowish green

Soluble pigment: Not produced

Growth: Good

(3) Glycerol-asparagine agar medium

Obverse: White, powdery, and aerial hyphae are slightly formed.

Reverse: Light yellow

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Good

(4) Starch agar medium

Obverse: White to grayish white

Reverse: Light yellow

Soluble pigment: Not produced.

Starch decomposing ability: Decomposable

Growth: Good

(5) Tyrosine agar medium

Obverse: White

Reverse: Light yellow to light brownish yellow

Soluble pigment: Not produced. Melanoid pigment  
is not produced.

Growth: Good

(6) Nutrient agar medium

Obverse: Aerial hyphae not formed.

Reverse: Light yellow

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Good

(7) Yeast malt agar medium

Obverse: White and velvety

Reverse: Bright yellow

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Good

(8) Oat meal agar medium

Obverse: White

Reverse: Light yellow to bright yellow

Soluble pigment: Not produced.

Growth: Good

3) Physiologic properties

(1) Optimum temperature for growth

Optimum at 20 to 30°C. No growth at 10°C or 37°C.

(2) Optimum pH for growth

Grows at pH 5.0 to 8.0. Optimum pH at 5.5 to 7.0

(3) Liquefaction of gelatin (on glucose-peptone-gelatin medium at 20°C)

No liquefaction

(4) Hydrolysis of starch (on starch agar medium)

Hydrolyzed.

(5) Coagulation and peptonization of skimmed milk (on skim milk medium)

Peptonized.

(6) Production of melanoid pigment (on tyrosin agar medium, peptone-yeast-iron agar medium, and tryptan-yeast extract liquid medium)

Not produced in any medium.

4) Assimilability of carbon sources (Pridham Gottliebe agar medium)

(1) L-arabinose -

(2) D-xylose -

(3) D-glucose +

(4) D-fructose -

(5)	Sucrose	-
(6)	i-inositol	+
(7)	L-rhamnose	-
(8)	Raffinose	-
(9)	D-mannitol	-

To summarize the above, the strain P6621 is a simply-branched strain belonging to the genus *Streptomyces*, and it usually develops straight aerial hyphae. According to the method of the International Streptomyces Project (ISP), judging from the colors of colonies on various media, this strain belongs to white series, and judging from the structure of the tips of aerial hyphae, it belongs to the RF (*Rectus flexibilis*) section. The strain rarely develops spores with smooth surface, and usually, spores are scarcely formed. It does not produce any melanoid pigment, and it assimilates D-glucose and i-inositol as carbon sources.

Among known *Actinomycetes* fungi, several strains which belong to white series and the RF section are known, and they are smooth on the spore surface and do not produce any melanoid pigment, but they are clearly different from the strain P6621 in the assimilability of carbon sources and other features.

The strain P6621 produces 7-(5-amino-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxilic acid which is a  $\beta$ -lactam antibiotic. Hitherto, the following twelve

ray fungi are known as strains which can produce said acid or similar  $\beta$ -lactam antibiotic, but they are different from the strain P6621 in microbiological properties: Streptomyces chartreusis, S. cinnamonensis, S. fimbriatus, S. griseus, S. halstedii, S. lactamdurans, S. rochei, S. viridochromogenes, S. lipmanii, S. clavuligerus, S. wadayamensis and S. jumonjinensis. Of the twelve strains, eight strains stated in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, are compared with the strain P6621 in the following.

Both S. chartreusis (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p 95, 1968) and S. viridochromogenes (ibid., vol. 22, p. 369, 1972) belong to the B (blue) series and to the S (Spira) section, and are different from the strain P6621. Both S. fimbriatus (Waxman, "The Actinomycetes", vol. 2, p. 208, 1961) and S. rochei (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p. 368, 1968) belong to the GY (gray) series and to the S (Spira) section, and are different from the strain P6621. S. cinnamonensis (Waxman, "The Actinomycetes" vol. 2, p. 195, 1961) belongs to the R (Red) series and to the S (Spira) section, and different from P6621. S. griseus (International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 18, p. 332, 1968), S. lipmanii (ibid., vol. 18, p. 140, 1968) and S. halstedii (ibid., vol. 18, p. 128, 1968) belong to RF (Rectus flexibilis) section. The former two belong to Y (yellow) series, and the latter one belongs to the GY (gray) series. Therefore, they are

different from the strain P6621.

The remaining four strains are compared below with the strain P6621. It is known that all these four strains produce 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy-3-cephem-4-carboxylic acid.

S. lactamdurans (Japanese Patent KOKAI No. 71-3286) is powdery and creamy in the color of aerial hyphae on various media, and it liquefies gelatin, unlike the strain P6621. Moreover, as regards the ability to utilize carbon sources, it uses L-arabinose, D-xylose, raffinose and D-mannitol, but does not use D-inositol and is quite different from the P6621. S. wadayamensis (Japanese Patent KOKAI No. 74-30593) is considered to belong to the S (Spira) section and is noticed to belong to the GY (gray) series through observation on an oat meal agar medium, a yeast malt agar medium, etc. It also forms a melanoid pigment. Therefore, it is noted to be different from the strain P6621. S. jumonjinensis (Japanese Patent KOKAI No. 74-42893) is also considered to belong to the S (Spira) section, and it is white to brownish gray in the color of aerial hyphae on a yeast malt agar medium. It also forms a soluble pigment and is different from the strain P6621 in regard to the carbon source-usability for many saccharides. Therefore, it is considered to be quite different from the strain P6621. As S. clavuligerus (C.E. Higgens & R.E. Kastner, International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 21,

P.326, 1971) is considered to be most closely related to the strain P6621, S. clavuligerus NRRL 2585 was used for tests for comparison with the strain P6621.

Properties found to be different between both these two strains are described below.

Difference in morphological properties

S. clavuligerus has one to four spore chains at the tip of each aerial hypha, and the head has such a special structure as to be roundly swollen to be branched, but the strain P6621 does not show such a structure, and aerial hyphae have simply straight tips.

Difference in properties on media

The difference between both these strains is shown in the following table.

<u>Culture Medium</u>	<u><i>S. clavuligerus</i></u>	<u>Strain P6621</u>
Sucrose nitrate agar medium	Growth: Poor Aerial hyphae: Not formed Reverse: Dark	Growth: Poor to medium Aerial hyphae: White Reverse: White
Starch agar medium	Aerial hyphae: Gray (2fe) to bright olive gray Reverse: Light yellow	Aerial hyphae: White (b) to grayish white Reverse: Dimmer light yellow than <i>S. clavuligerus</i>
Yeast malt agar medium	Aerial hyphae: Bright grayish olive color (1-1/2 ge) to bright brownish gray (3fe) Reverse: Grayish yellow to bright yellow	Aerial hyphae: White (b) Reverse: Light yellow to bright yellow

Assimilability of carbon sources

<u>Saccharaide</u>	<u><i>S. clavuligerus</i></u>	<u>P6621 strain</u>
D-glucose	-	+
i-inositol	(+)	+

As stated above, on a yeast malt agar medium and a starch agar medium, *S. clavuligerus* has spores adhering abundantly and produces grayish green aerial hyphae, while the P6621 has spores adhering poorly and produces white aerial hyphae. Furthermore, they are different in the ability to utilize D-glucose and in the morphological feature at the tips of aerial hyphae.

Based on the above findings, the strain P6621 does not coincide with any known strain, and it should be recognized as a new strain belonging to the genus *Streptomyces*.

The *Streptomyces* strain P6621 has been deposited in Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as deposit No. FERM-P 2804.

S. katsurahamanus strain (Japanese Patent KOKAI No. 78-104796) capable of producing clavulanic acid, which was reported later than the strain P6621, is also a strain considered to belong to the S (Spira) section, and is grayish blue in the color of aerial hyphae on a yeast malt agar medium. It forms a soluble pigment and can not utilize D-glucose or D-inositol, and it is positive in gelatin liquefaction. Therefore, it is considered to be quite different from the P6621. Since it is generally well known that mutation of actinomycetes occurs frequently, the new strain P6621 belonging to the genus *Streptomyces* in the present invention includes all the spontaneous and artificial mutants. Namely, it includes all the strains which produce clavulanic acid and which can not be clearly distinguished from the strain P6621.

The cultivation of the strain P6621 in the present process is carried out according to a usually used conventional cultivation method for producing antibiotics from *Actinomycetes* fungi. Namely, shake-cultivation or submerged

aerated-cultivation is preferable. As for the medium ingredients, dextrose, glycerol, sucrose, soluble starch, lard, soybean oil, dextrin, molasses, etc. may be added as carbon sources. As nitrogen sources, meat extract, peptone, Casamino acid, corn steep liquor, soybean meal, cotton seed meal, casein, dry yeast, peanut meal, ammonium sulfate, sodium nitrate, potassium nitrate, etc. may be added as inorganic salts, potassium dihydrogenphosphate, dipotassium hydrogenphosphate, calcium carbonate, magnesium sulfate, iron sulfate, sodium chloride, potassium chloride, etc. may be added. As required, methionine, a trace amount of heavy metals, vitamins, antifoamer, etc. may be added. The incubation is carried out at 18 to 30°C. The amount of the active ingredient in the culture broth in the progress of cultivation is determined by the disc test method using the Comamonas terrigena B-996 as the test microbe. Usually, the amount of the active ingredient reaches the maximum in 40 to 75 hours.

Clavulanic acid as produced and accumulated mainly in the liquid portion of the culture broth can be recovered and purified by conventional adsorption and elution methods.

For instance, the recovery may be carried out by optionally combining the adsorption on active carbon or activated granular active-carbon or a porous aromatic polymer having amine groups and phenolic hydroxyl group at the

surface (trade name: HS-resin available from Hokuetsu Carbon Industrial Co.), with the elution by an aqueous solvent such as methanol, ethanol, water or aqueous acetone, or with adsorption-elution by an anion exchange resin such as Dowex 1x2 (made by Dow Chemical), porous crosslinked polystyrene strong anion exchange resin (trade name: Diaion PA306 made by Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.), crosslinked dextran strong anion exchange resin (trade name: QAE Cephadex A25 made by Pharmacia), etc., or gel filtration by crosslinked dextran (trade name: Cephadex G-10 made by Pharmacia), Bio-Gel P-2 (made by Biorad), or chromatography on the column method or the thin layer method using DEAE (diethylaminoethyl)-cellulose, DEAE-crosslinked dextran matrix (trade name: Cephadex made by Pharmacia), crystallized cellulose (trade name: Avicel made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), or by repeatedly using these methods.

The active ingredient, P6621 Factor 3 as accumulated in the culture broth of the strain P6621 gives  $R_f = 0.30$  in the descending paper chromatography developed with a developing solvent (eluent) comprising 120 ml of acetonitrile, 30 ml of 0.1M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.5), and 1 ml of 0.1M EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid). Because P6621 Factor 3 shows antibacterial activity against the Comamonas terrigena B-996, it can be detected by bioautography using it. P6621 Factor 3 gives a single

active-spot by performing co-chromatography with an authentic clavulanic acid.

The P6621 Factor 3 (sodium salt) isolated by the above method gives the following physicochemical properties.

Ultraviolet absorption spectrum: Does not give any special ultraviolet absorption at 220nm or more in methanol.

Infrared absorption spectrum: The infrared absorption spectrum of P6621 Factor 3 (sodium salt) measured by the KBr pellet method shows the following characteristic maximum absorption wave numbers, as shown in Fig. 1.

Approx. 1790 cm<sup>-1</sup> ( $\beta$ -lactam ring -CO-)

Approx. 1700 cm<sup>-1</sup> (-C=C-O-)

This infrared absorption spectrum perfectly coincides with that of authentic clavulanic acid (sodium salt).

P6621 Factor 3 (sodium salt) gives a minimum inhibitory concentration (MIC) of about 31  $\mu$ g/ml against Staphylococcus aureus Russel strain, when measured by a dilution method on agar.

These properties perfectly coincided with those of an authentic clavulanic acid (sodium salt), and it was confirmed that the active ingredient P6621 Factor 3 is clavulanic acid.

Example for the present invention is described below. The essential part of the present invention resides in a method of aerobically cultivating the new actinomycetes strain P6621, to accumulate clavulanic acid in the culture.

The Example is merely illustrative, and the present

invention is not limited thereto. In the Example, % means g/dl %, unless otherwise specified.

Example 1

*Actinomycetes, Streptomyces* sp. P6621 strain, which has well grown on the ISP-2 slant agar medium, was inoculated at one platinum loopful amount into a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of the following seed culture medium SE-4, and shake-cultivation was carried out at 28°C for 48 hours, on a rotary shaker.

SE-4 Medium:

Meat extract	(made by Difco)	0.3%
Tryptone	(made by Difco)	0.5
Glucose		0.1
Soluble starch		2.4
Yeast extract		0.5
Calcium carbonate		0.4
Defatted soybean meal (Essan M)		0.5
pH 7.5 (adjusted by sodium hydroxide before sterilization)		

The cultured broth was inoculated in 1 ml-portions into each of sixty 500 ml capacity-Erlenmeyer flasks sterilized under pressure and containing 100 ml of the following production medium, and shake cultivation was carried out at 28°C for 48 hours, on a rotary shaker.

Production medium:

Soluble starch	2.0%
----------------	------

Glycerol	0.3
Defatted soybean meal	1.0
Corn steep liquor	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01

pH 7.0 (adjusted by sodium hydroxide before sterilization)

The cultured broth was collected, and the cellmass was separated by centrifugation. The supernatant solution (5 l) was obtained. It was fed through a column packed with 200 ml of crosslinked polystyrene strong anion exchange resin "Diaion PA 306" ( $\text{Cl}^-$ -form) (available from Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.), to adsorb the active substance. The column was washed with 400 ml of distilled water, and subjected to an elution using an aqueous sodium chloride solution with a linear concentration gradient of 0 to 1 M. The eluate was collected in 20 ml-fractions. Active fractions Nos. 18 to 29 (the activity was measured by bioassay with Comamonas terrigena B-996 as the test microbe) were collected, and passed through a column packed with 100 ml of porous aromatic polymer, "HS-resin" (available from Hokuetsu Carbon KK) having amine groups and phenolic hydroxyl groups at the surface, for the adsorption. The column was washed with 100 ml of distilled water, and subjected to an elution using aqueous acetone with a linear concentration gradient of 0 to 30%. The eluate was collected in 10 ml-fractions. The respective fractions were subjected to a descending paper chromatography using a following developing-solvent, and fractions Nos. 5 to

12 rich in the active substance and showing  $R_f = 0.30$  were collected.

Developing solvent for paper chromatography:

Acetonitrile 120 ml

0.1M Tris hydrochloric acid buffer solution (pH 7.5) 30 ml

0.1M EDTA (pH 7.5) 1 ml

Fraction Nos. 5 to 12 were fed through a column packed with 20 ml of crosslinked dextran-matrix strong anion exchange resin, "QAE Cephadex A-25" (a product of Pharmacia), for the adsorption. The column was washed with 20 ml of distilled water, and subjected to an elution using NaCl solution with a linear concentration gradient of 0 to 1 M. The eluate was collected in 20 ml-fractions. Active fractions Nos. 18 to 23 were collected and adjusted to pH 2.5 by aqueous hydrochloric acid solution, followed by extraction with an equal amount of n-butanol added. The upper n-butanol layer was taken, and was added with a 0.01 M phosphoric acid buffer solution (pH 7.0) at a volume of 20% based on the amount of the upper layer taken, for the extraction. During extraction, pH was examined, and the solution was adjusted to 7.0 with sodium hydroxide. The aqueous layer was taken, and subjected to gel-filtration on the crosslinked dextran-matrix "Cephadex G-10" (a product of Pharmacia). The column was developed using distilled water. Active fractions were collected and freeze-dried. A sample of the freeze-dried material was

dissolved into a small volume of deionized water, and the resulting solution was fed through a column packed with 200 ml of chromatographic cellulose (Whatman CC31), for adsorption. The column was developed with the upper layer of n-butanol : ethanol : water (4 : 1 : 5) as the eluting solvent. The active fractions were collected and dried under reduced pressure on a rotary evaporator. The residue was dissolved into a small amount of distilled water and freeze-dried, to obtain 18 mg of sodium clavulanate.

Brief description of Drawings

Fig. 1 shows an infrared absorption spectrum of sodium clavulanate obtained from the culture of *Streptomyces* SP. P6621 strain, when measured by the KBr tablet method.

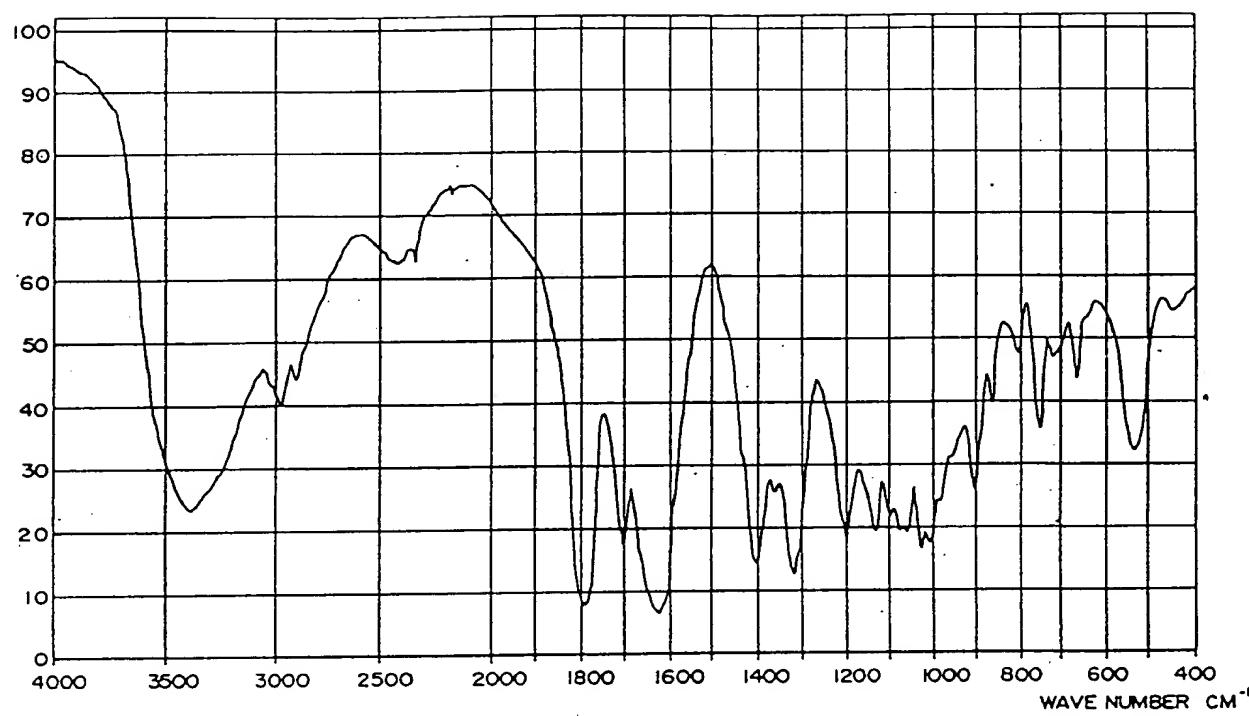
Applicant: Sanraku-Ocean Company Ltd.

Agents: Takeshi Yano, and two others

FIG. 1

145855-162993(8)

第 1 図



## ⑯ 公開特許公報 (A)

昭55-162993

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 17/18  
//(C 12 P 17/18  
C 12 R 1/465)

識別記号

厅内整理番号  
7115-4B

④公開 昭和55年(1980)12月18日

6760-4B

発明の数 1  
審査請求 有

(全 8 頁)

## ⑤ クラバラン酸の製造法

② 特願 昭54-72085  
② 出願 昭54(1979)6月7日  
② 発明者 岡村和彦  
藤沢市藤沢2502-1  
② 発明者 石倉知之

⑦ 発明者 河野景明  
東京都大田区池上7-16-3  
⑦ 出願人 三楽オーション株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号  
⑦ 代理人 弁理士 矢野武 外2名

## 明細書

## 1. 外部の名称 クラバラン酸の製造法

## 2. 特許請求の範囲

1. ストレプトミセス菌に由する新規、P4421菌株(登録番号昭54-2804号菌)を好気的に培養し、その培養液にクラバラン酸を蓄積させることを特徴とするクラバラン酸の製造法。

## 3. 外部の詳細な説明

本発明は、ストレプトミセス菌に由する新規、P4421菌株によるクラバラン酸(*Culavulanic acid*)の製造法に関するものである。

クラバラン酸は、コールラビによってストレプトミセス・クラブリグニス(*Streptomyces clavuligerus*)の培養液から単離された物質(特公昭52-341994号及びエー・ジー・ブラウンら:ジ・ナル・オブ・アンティビオティクス(A. O. Brown: *Journal of Antibiotics*)第29号、666頁(1976年12月号)であって、そのグラム陽性及び

陰性菌に対する抗菌活性は比較的弱いが、セロトクタマイセス菌等は強く、メトラクタマイセス菌等として知られる化合物である。そのメトラクタマイセス菌等を用いて、ベニシリシやセファロスボリン等を併用することにより、メトラクタマイセス菌等の耐性菌に対するこれらメトラクタマイセス菌等の抗菌活性を増大させることができ出来る。また、不溶性は折紙た性質を有し、その性質を有する半合成メトラクタマイセス菌等の合成物としての性質を有する有用物質である。現在までの所、クラバラン酸生産菌としては、ストレプトミセス・クラブリグニス(*S. culavulanicus*) YRRL 3585, ATCC 27064, PERM-P 3001(特公昭52-341994号)、及びストレプトミセス・ジーソモンジネンシス(*S. Jussoensis*) ATCC 3008株, PERM-P 1545, YRRL 3741, (特公昭52-341994号) 及びストレプトミセス・カントリハニス(*S. kantorekabae*) PERM-P



## ①イーストヌクル大酵母

株　　菌：白色、ビード状

株　　菌：明るい白色

可溶性色素：三塩セナ

株　　菌：良好

## ②オートミール酵母

株　　菌：白色

株　　菌：暗灰色～明るい灰色

可溶性色素：三塩セナ

株　　菌：良好

## 3) 三塩的性質

## ①三塩の生成性質

20～30℃が最適。10℃以下では生成せず

す。

## ②三塩の生成pH

pH 20～80で生成する。pH 55～70が最適

## ③セラチンの液化 (グルコース・ペプトン・セラ

(7)

## ④シクロース

-

## ⑤1-イソシトール

+

## ⑥レーテムノース

-

## ⑦ラフィノース

-

## ⑧ローマンニット

-

以上をまとめると、P4621菌株は、ストレプトセス族に属する平均分枝の菌株で、過半は直状の菌糸由来を有し、インテーナン・ナム・ストレプトセス・プロジェクト (ISPと略す) の万菌株より得。各種培地にかける菌糸の比較の結果で白色シリースに最も、次に菌糸先端の菌糸からみてRP (Rectus Flexibilis) セタシ・シルムに最も近い。本菌株は最初の子孫を約10代で生じ、通常は孢子を形成しないが、ノランジウム色で三塩セナで、ローダヘルコース、1-イソシトールを反応原としてM化する。

公知の菌糸由来中で白色シリース、RPセタシ・シルム、孢子菌糸が子孫でノランジウム色を

サンヨコ上、20℃

液化せず。

④スマーナの四次分枝 (スマーナ大酵母上)  
分枝する。

⑤炭酸ナトリウム、ペプトン化 (スマーナヘクタ  
ニ)

ペプトン化する。

⑥メラニン色素の生成 (テロシン大酵母上、及びペト  
リトン・イースト大酵母上、及びペトリ  
トン・イーストニヤス被体培養液)

何れの培養でも生成せず。

4) 反応原のM化性 (アリドハム・ゴドリープ  
大酵母上)

## ①ルーアラビノース

-

## ②ローキシロース

-

## ③リーグルコース

+

## ④ローフラクトース

-

(8)

生成しないものが数種知られているが、何れもメラニンの同化性並びにその他の分枝に外れた反応が認められ、P4621菌株に該当する場合は見出せない。

P4621菌株は、ノーラクタム菌生地で最も  
-(3-アミノ-3-カルボキシペルアミド)  
-3-カルバモイルアミドルートメトキシ-  
-3-セフム-1-カルボン酸を生成するが、次  
にて代謝されることは公知のノーラクタム菌三塩  
セナとして、次の12種の反応性が知られている。  
が何れもP4621菌株とは生物学的特徴を有する  
:  
Streptomyces chartreusis, S. cinnamonealis,  
S. fimbriatus, S. griseus, S. halstedii, S. la-  
ctandurans, S. rochei, S. viridochromogenes,  
S. lipmanii, S. clavuligerus, S. vadameensis  
及びS. juncicola。以上は公知のうち、イダバ  
ージ・イメ・マニ・アヘ・メブ・ダメ・キナ  
・ブ・バクナリオロジー菌の既に記載されている  
・菌について、本菌株と比較をする。

(9)

(10)

*S. escharthomiae* (インテーナシ) ナル・ジャーナル・オブ・システィマティック・バクナリメロジ - Internat. J. System. Bacteriol. 18 号 75 号 (1968 年) 及び *S. viridochromogeneae* (同上 22 号 369 号、1972 年) は元 C 9 (青色) シリーズに属し、*S. (Spiral)* セクションに属する菌体でもり P4421 菌体とは異なる。*S. fimbriatus* ワックスマン等「ジ・アクナノミセナス」2 号、208 号、1961 年) 及び *S. rochellei* (インテーナシ) ナル・ジャーナル・オブ・システィマティック・バクナリメロジ - 18 号、368 号、1968 年) は元 C 9 (灰色) シリーズに属し、*S. (Spiral)* セクションに属する菌体でもり、P4421 菌体とは異なる。

*S. cinnamonensis* (ワックスマン等「ジ・アクナノミセナス」2 号、195 号、1961 年) は C 9 (赤色) シリーズに属し *S. (Spiral)* セクションに属し、P4421 菌体とは異なる。*S. griseus* (インテーナシ) ナル・ジャーナル・オブ・システィマティック

・バクナリメロジ - 18 号、332 号、1968 年)、  
*S. lipmanii* (同上 18 号、140 号、1968 年) 及び  
*S. bailestedi* (同上 18 号、123 号、1968 年) に  
何れも R (Rectus flexibilis) モクシ・シベス  
トも菌体であるが前二者は C (灰色) シリーズに  
属する菌体であって P4421 菌体とは異なるのである。

次に、残りの 4 株について P4421 菌体と比較する。これら 4 菌体は何れも T - (S - アミノ - S - カルボキシペルアミド) - T - カルバセイコキシメチル - T - メトキシ - T - セフ - ム - T - カルボン酸を生成することが知られている。

先ず、*S. lactamuriae* (日本公報特許公報、特開昭 46 - 3284) は各培養液に与ける滅菌培养の色が培养液、クリーム色であって、セラチンを液化する点 P4421 菌体とは異なるが、次に又滅菌の滅菌性においても、レーアラビノース、D - ナシロース、ラフィノース、D - マンニットを利用

し、ユ - イノシトールを利用しないなど P4421 菌体とは全く異なる菌体である。*S. yadayamensis* (日本公報特許公報、特開昭 49 - 30593) は S (Spiral) セクションに属する菌体と考えられ、オートクーヘンダル法及びイースト液体培养液での供給より C 9 (灰) シリーズに属する菌体と考えられ、メラニン様色素も形成するので、P4421 菌体とは異なるものと考えられる。

*S. jumonjinensis* (日本公報特許公報、特開昭 49 - 42693) も S (Spiral) セクションに属すると考えられる菌体でもり、イースト液体培养液での滅菌培养の色が白～茶灰色で、可溶性色素を生成する点、及び D - 水溶性利尿性が多くの点で異なる点から P4421 菌体とは全く別の菌体と考えられる。最後に、P4421 菌体と最も近似していると考えられる *S. clavuligerus* (C. E. Higginson & R. E. Kestner インテーナシ) ナル・ジャーナル・オブ・システィマティック・バクナリメロジ - 21 号、

326 号、1971 年) について *S. clavuligerus* NRRL 2585 を用いて、P4421 菌体との比較試験を実施した。

次にこの両者間にについて並行の始められる三点について併記する。

#### 形態的・生化上の異同

*S. clavuligerus* は滅菌培养の先端に 1 ～ 4 本の孢子梗をつげ、その梗頭は又く上くれて分枝する特徴的構造を形成するが、P4421 菌体にはかかる構造は観察されず、滅菌培养の先端は子嚢状様である。

#### 生化的・生化上の異同

両者の生化を次に表示する。

母	<i>S. clavuligerus</i>	P 6421 国
ショクロース	三 面: 不良	三 面: 不良~白色
新 墓 植	水中菌糸: 深灰色	水中菌糸: 白色
新 天 地	菌 面: 白色	菌 面: 白色
	水中菌糸: 灰色(220) ~弱いメリ 一ノア灰色	水中菌糸: 白色(?)~灰色 白
スメーナ新大 名 墓	菌 面: 深灰色	菌 面: 互 <i>S. clavu-</i> <i>ligerus</i> + リーフはナゲ 元灰色
	水中菌糸: 弱い灰色 リーフ(1 1/2g)~ 弱い灰色 (320) =	水中菌糸: 白色(0) リーフ(1 1/2g)~ 弱い灰色 菌 面: 灰色~弱い 灰色 =
イースト支那 新 天 地	菌 面: 灰色~弱い 灰色	菌 面: 灰色~弱い 灰色

## 又ヌカの同化

母	<i>S. clavuligerus</i>	P 6421 国
ロードルコース	-	+
リ-イノシトール	(+)	+

上記の通り、イースト支那の天母は立派でヌカ  
一ノア天母に似て、*S. clavuligerus* に由来する  
三が立派で灰灰色の水中菌糸を形成するものと  
して、P 6421 国株は孢子嚢が灰白色で白色の水中菌糸を  
形成する点、並びにロードルコースの利用で又  
10 水中菌糸の形態的特徴について前者の天母は  
立派な菌糸が認められる。

以上のお見方より、最初は天母に一ノアのもの  
が見出せないので P 6421 国株はストレプトミセス  
菌に由来する新天母と認めらるが天母である。

このストレプトミセス菌 P 6421 国株は、工業生  
産既往の工業化菌の元祖とされ、天母の母  
母 2804 号として記載されている。

P 6421 国株より天母が抽出されたクラバラン母

49

菌株 *S. kaceugabaezuei* の同化 53-104296 16  
3 *S. apical* セクシ。ンに由来すると考えられる菌株  
である。イースト支那新天母の水中菌糸の色  
が灰色で、可溶性色素を形成する点、ロードル  
コース、リ-イノシトールを利用出来ない点、並  
びにセラチン消化能性である成母から P 6421 国  
株とは全く別の菌株と認められる。成母菌が天母  
であることは一般によく知られていることであ  
るが、本菌株についてもイーストストレプトミセス  
菌由来である可能性、P 6421 国株は天母の自然あるいは  
10 人工実生株のすべてを含むとする。すなはちクラバ  
ラン菌を含むし、P 6421 国株と明確に区別しえ  
ない菌株すべてを含むとする。

本菌株の天母に由来する P 6421 国株の用途は天母  
15 由来する天母の抗生素質三種のための公知の  
用途に由来して行われる。すなはちセラチンは  
細胞壁あるいは、成母菌の培養が行われておき、  
細胞壁は以実生として、ブドー粉、タリセリ粉

ショクロース、可溶性色素、ラード油、大豆油、  
デキストリン、糊粉等：粗天母としては、牛肉ニ  
キス、ペプトン、カブミノロ、コーン・スター、一  
ノアリカー、大豆油、糊粉ロ、カゼイン、必須ア  
ミノ酸、花生粉、蜂蜜アンモニウム、硫酸ソーダ、  
硫酸カリ等：無天母としては、クレンニーカリ、ク  
レンニニカリ、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、  
硫酸鉄、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム等が使用  
され、必要に応じてメタオニン、胱氨酸の無天母、  
ビタミン、防腐剤等が添加される。母天母は 1-3  
で行われる。培养の培地は天母の天母成母の天母の天母  
成母は、コマモナス・ナリゲナ (*Cosmoplasma*  
*corrugata*) B-919 を成母としテ、スク・ヌ  
足菌により構成される。培养は 40-75 時間で、  
上記倍数以分母は成母とされる。

母天母中、天母として成母が天母を形成され  
クラバラン菌は、公知の抗生素質、糊粉等に由来  
して行われる。

50

アミカラムスは、古三又は古三化成及び古三又  
アミカラ、アイン西、フノーハ生水販売を終  
え日本多九三ガヨモボリマー（商標名出-古三  
（古三又ス工業社）等による販売と水三浴剤  
又はメタノール、エタノール、水、アセトン等  
による販売、又はヨイイオン又或は組合元にダクニ  
ンクスIXL（ダクニミカル社）・多九三又ア  
モヨボリスチレンヨモイイオン又或は組合（商標名ダ  
イハイイオンPA304（三文化成社）・又アモヨモ  
テス特朗ヨモイイオン又或は組合（商標名QASセフ  
トテックスA25（ファーマシア社）等による販  
売用口、もろいはグルイ用又ア結合テス特朗  
（商標名セフテックスS-10（ファーマシア社  
））、ハイオ・グルコ-2（ハイオラッド社、既）等に  
よるグルコ-2、もろいは DZAE（デエナルアミノ  
ニカル）-セルロース、DZAE-又ア結合テス  
トラン・マトリックス（商標名セフテックス（  
ファーマシア社））、結晶化セルロース（

2200日以上に亘りの紫外線吸収を有します。

以上が本校スペクトル：P6421 - フォスター-31  
ナトリウム線 10 KBr 薄剝片で測定したが外  
部吸収スペクトルには約 1 個の過りで、Tc の  
特徴を欠く吸収波を示す。

约  $1790\text{ cm}^{-1}$  (  $\text{--} \text{C}=\text{O} \text{--} \text{C}_6\text{H}_4 \text{--} \text{C}=\text{O} \text{--}$  )

at 1700  $\text{cm}^{-1}$  (-C=C-O-)

この以外吸収スペクトルはオーセンティックな  
クロバラン酸(ナトリウム塩)のそれと完全に  
一致した。

P4421 - フタタメ - 3 (ナトリウム型) は、本  
大腸菌で増殖してスタフィロコッカス・アフレ  
クス・ラ・セハ株 (Staphylococcus aureus Russel)  
に対して約 1.49% の殺菌止菌率 (MIC) を示  
す。

これらの性質は、オーセンティックなクラバドン酸ナトリウム盐の性質と完全に一致し、同量のカルボン酸 - フラクトー糖クラバドン酸ナトリウム

6月25日 162993(3)  
各テレマヘ(油化エ工業55)、シリカグヘテ  
ミルカラムガニムに所用生ヒニクロマトグラフ  
キルガムをヨリおみせをさせて、ヨリギニテヒ  
ルモスはして用ひて所要アムニコメテキ。  
P6621 各次ヒニクガムは中でヨリモハルヨリ  
ケ P6621 - フタクターとは、アモトニトリヘヒ  
ム、21M EDTA-EDC 及ウム(2H 25) 30 ル、41M  
EDTA(ニナレンジアミン四酢酸)1ヒヨリナム生  
所用ヒテ生用した下地用ペーパークロマトグラフ  
ヒードヒテヨリ250を与える。 P6621 - フタ  
クターにコマモナス・ナリゲナム-996ヒムモニ  
モボアヒテ、これ用いたビオオートグラフ、一  
ヒヨリタロモレル。 P6621 - フタクターにエー  
ンチックなクラベラン風ヒコ・クロマトグラ  
フヒテ行うヒテ、单一の底ニスボアヒテヒテ

上記万能で平成される 24421 - フックター。  
ナトリウムヨウは久ひ進化学的三対をもつ。  
外観スペクトル: メソーナルコドウにて

20

◎ 6 月 20 日

久に不透明の異物を示すが、半透明の本質に  
此種の所見は 26421 例を計りて、  
そのうち半数にクリバラン病と呼ばれる万能を  
持つと丁度 1 ので、此の異物は半に七の所  
がてあり、此の外に此の万能にのみ規定され  
てはいたい。以下を正規化する。 2/11 2000

四九九

152 - 2 種の牛糞上に充分生育した放題  
Streptomyces sp. 26621 休む一日生長を下  
げ、生長用母母 32 - 4. 5mm を入れた 250 ml 三  
角フラスコで培養し、20°C で 5 日、ロード  
一ノードで、40 分回転振とう。

32 - 4 雜誌

午 内 エ キ パ (Disco と 開)	us
トリプトン ( )	as
グルコース	us

可溶性蛋白	24.5
神代ニヤス	4.5
CaCO <sub>3</sub>	24.5
硫酸大豆粉(ニスアン-ダ)	4.5
3 Pd 2.5 (硫酸銅水溶液で調整)	
Cの用意液を、下記三液浴の100 mlを入れ加温し 出した500 ml各三片フラスコ40 mlに、各1 ml 加温し28℃でかいて、ロータリーシューカーにて 48時間振盪を完了。	
10 三液浴	
可溶性蛋白	20.5
グリセリン	0.5
硫酸大豆粉	2.0
コーンスナップブリカ	0.1
15 FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01

ペーパークロマトグラフィーの結果	アセトニトリル	120 ml
0.1M Tris-HCl 液相反 (pH 2.5)		3.0 ml
0.1M EDTA (pH 2.5)		1 ml

これを次ア用合デキストラシ・マトリックス出  
イメン又共用記 QAE - セファデックスム - 25 (1  
ファルマシア社製) 20 mlを丸洗じたカラムに溶  
し放水させた。20 mlの蒸留水でカラムを洗浄し  
た後0~1 mlの量級的検液内配をつけた水溶液で  
溶出した。20 ml光のフラクシ。ンセは取下る。  
溶性部分 (フラクシ。ンス 16~23) を取め、溶  
媒水にて pH を 2.5 に含し、各々のローブタノーベ  
ルを加し、相図を行った。上層のローブタノーベ  
ルを採取し、1/3 及び 0.01 リン酸鉄鉱粉 (pH  
2.0) を加え、相図を行った。相図中 pH をしらべ  
NaOH にて 2.0 に調整した。水層を採取しゲルに加  
用メアロジデキストラシ・マトリックス、セファデ  
ックスム - 10 (ファルマシア社製) にてグヘム

162993(7)  
当西イメン又美留江・ダイタイメン 200cc を充満したカラム (C2-2)  
に通し、店舗面積を均等化せよ。カラムを 400cc  
の蓄留水で充満した後、リーマーの風船的形状均  
配をついた天板水で充満する。200cc のフラク  
ションを採取した。C の店舗面積 (店舗は、50000  
50000 50000 5-196 を以てとす) バイオア  
クセイドによって行った) を決め、(フラクション、シ  
ル 18 ~ 29 のシンセ、フェノール蓄留水を充  
満しておる多孔質ガラスボリマー 48 ~ 50 の  
粗度水) 100cc を充満したカラムに通しよせ  
せよ。100cc の蓄留水にてカラムを充満した後  
0 ~ 30% の風船的形状均配をついたアセトン水で  
排出を行う。10cc のフラクション。シを採取する。  
各フラクションを下記並列容器で下記並べ一  
クロマトグラフィーを行い、 $R_f=0.50$  を示す店舗  
面積に当り四分 (フラクション、シ番 5 ~ 12) を採  
用。

4. 開田の開拓と開拓

第1 図はストレートミセス・エスピー-26621号の当最初からはられたクラバランニアトリウムのEPR試料で測定した。が外観は以下スペクトルを示す。

井戸口四人 三井オーシン 天台社  
元三井 天井又 (片かき)

